

Starose Mars MMA

产 品 说 明 书

Starose Mars MMA

【产品简介】

Starose Mars MMA 介质为阴离子交换混合模式层析介质，介质同时具有离子、疏水和氢键等多作用力，在应用过程中可以耐受样品中一定程度的盐含量。对于结合模式层析（目的蛋白与介质结合），通过高盐或低 pH 梯度洗脱可获得与传统离子交换介质不同的分离效果。对于流穿模式层析（目的蛋白不与介质结合），可有效的吸附样品中杂质，特别是在抗体的纯化过程，应用 Starose Mars MMA 介质进行流穿模式纯化，可有效吸附亲和层析后样品中脱落的蛋白 A 配基，以及残留的 HCP、HCD、聚体、内毒素和病毒等杂质。

Starose Mars MMA 介质基质为星谱第二代高流速、高载量基质。在 0.3 MPa 下，Mars 基质可耐受最高 1000 cm/h 流速。同时，改进后的孔道结构能够实现介质在高流速下的高载量。

Starose Mars MMA 离子交换层析介质具有以下特点：

1. 快流速
2. 高动态结合载量
3. 在抗体纯化过程中能有效去除 Protein A、HCP、HCD、聚体、内毒素和病毒等杂质
4. 可实现抗体的两步纯化工艺
5. 易于从实验室小试到工业生产规模工艺放大
6. 产品批次间稳定性高

【性能参数】

基质	高交联度琼脂糖
平均粒径	75 μm
离子交换类型	多模式强阴离子
离子交换容量	mmol Cl ⁻ /mL gel
最大耐压	0.3 MPa
pH 稳定性	3-12（工作；长期）；2-14（再生、清洗和消毒；短期）
化学稳定性	常规水相缓冲液，1 M 醋酸，1 M 氢氧化钠等
储存条件	20%乙醇，4-30 $^{\circ}\text{C}$

【实验建议】

1. 装填层析柱

1.1 介质清洗

方法一：取 Starose Mars MMA 介质，转移至 G3 砂芯漏斗中抽滤，加入去离子水搅拌、洗涤、抽干，重复洗涤抽干 3 次，最后抽干 20 min。将介质用去离子水重悬，超声 30 min 去除气泡，超声过程中轻轻搅拌介质。

方法二：取 Starose Mars MMA 介质，静止，待介质完全沉淀后，弃去上清液，加入与

介质等体积或更多去离子水搅拌、清洗，静止，弃去上清液，重复清洗 3 次待用。

1.2 层析柱介质装填

1.2.1 检查仪器设备稳定性

取待装填层析柱，检查装柱器、层析柱上下适配器和柱管的完整性，包括胶圈是否缺失或损坏、连接软管是否通畅完整、接头状态、筛板是否丢失、筛网是否破损、玻璃柱是否有裂痕等，检查层析系统是否存在背景压力。

1.2.2 固定层析柱

确认层析柱和层析系统无误后，用去离子水清洗层析柱（如有需要可超声清洗），将层析柱下端适配器连接到层析系统，排出适配器内气泡，再连接到层析柱管下端，并保留约 1 cm 高度的装柱液（防止加入填料时柱底部产生气泡），将装柱器连接到柱管上端，固定层析柱垂直于桌面摆正。

1.3 第一步 恒流装柱

- 1) 装柱前将所有材料控制在相同温度（室温或 4 °C）。
- 2) 用玻璃棒搅拌将介质重悬，搅拌过程不可使用磁力搅拌器等剧烈搅拌方式，同时过程中不可用玻璃棒敲打烧杯内壁，以防介质因外力受损。将重悬后的介质一次性倒入层析柱中，倒入过程中使用玻璃棒轻靠层析柱内壁进行引流，防止倒入过程中产生气泡。
- 3) 将介质倒入层析柱后，快速连接装柱器上端，并打开层析系统泵，流速范围 30-60 cm/h，待介质胶面稳定。稳定后，取下装柱器，将层析柱适配器上端连接至层析系统，并排出内部气泡，插入层析柱中，在距离胶面上端 1-2 cm 处固定。

1.4 第二步 恒压装柱

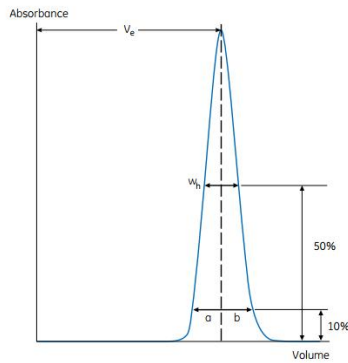
将层析系统设置为 0.1 MPa 恒压装柱，时间 1 h，用 Marker 笔记录最终胶面位置。恒压装柱结束后，将层析柱下端封死，断层层析柱上端与系统连接，轻松上端适配器密封胶圈，将上适配器下压至胶面下 2 mm 处，拧紧密封圈，静止层析柱 10 min，装柱结束。

1.5 柱效检测

方法一	丙酮检测方法	
	平衡液	去离子水
	样品	1%丙酮水溶液，上样 1%柱体积
	流速	30 cm/h
	检测器	紫外吸收 UV 280 nm
方法二	氯化钠检测方法	
	平衡液	0.4 M NaCl 溶液
	样品	0.8 M NaCl 溶液，上样 1%柱体积
	流速	30 cm/h
	检测器	电导率

计算柱效：

根据理论塔板高度 (Height equivalent to a theoretical plate, HETP)、理论塔板数 (Number of Theoretical Plates, N) 和非对称因子 (Asymmetry factor, As) 可有效的评价层析柱的性能。



柱效按式 (1) 计算:

$$N = 5.54 \left(\frac{V_R}{W_{h/2}} \right)^2 \dots \dots \dots (1.1)$$

式中:

N ——理论塔板数

V_R ——进样点到色谱峰极大点的距离, 单位为毫米 (mm)

$W_{h/2}$ ——半高峰宽, 单位为毫米 (mm)

$$HETP = \frac{L}{N} \dots \dots \dots (1.2)$$

式中:

HETP ——理论踏板高度

L ——柱高, 单位为厘米 (cm)

N ——理论塔板数

$$As = \frac{b}{a} \dots \dots \dots (1.3)$$

式中:

As ——非对称因子

a ——峰高为 10%时所对应的左半峰宽, 单位为毫米 (mm)

b ——峰高为 10%时所对应的右半峰宽, 单位为毫米 (mm)

2. 样品准备

2.1 样品溶液需离心后, 经 0.22 或 0.45 μm 滤膜过滤, 去除细小颗粒物, 防止堵塞层析柱和层析系统。

2.2 样品缓冲液 pH 值和电导率值与平衡缓冲液保持一致或接近。

3. 平衡

3.1 推荐平衡缓冲液: 10-50 mM PB/Tris, 0.05-0.2 M NaCl, $\text{pH} > / < \text{pI}$ (目的蛋白); (优化: 根据样品稳定条件可调整缓冲液成分; 溶液 pH 大于目的蛋白 pI, 则目的蛋白于介质结合, 溶液 pH 值小于目的蛋白 pI, 则目的蛋白流穿; 一定程度的盐含量有助于蛋白/杂质与介质疏水基团结合)。

3.2 流速: 90-150 cm/h。

3.3 用平衡缓冲液平衡层析柱 5 CV (通常 3-5 CV), 当流出液的 pH 和电导率与平衡缓冲液相同时, 表明层析柱完全平衡。

4. 上样

4.1 将预处理好的样品泵入层析柱, 流速 90-150 cm/h。

4.2 慢流速可获得更好的分离效果，但会增加操作时间。

5. 淋洗

上样结束后，用平衡缓冲液继续冲洗层析柱，直至紫外吸收值接近基线或平稳。

6. 洗脱

根据不同的纯化模式（结合或流穿），洗脱方式会有所不同，对于结合模式（目的蛋白与介质结合）建议使用 pH 梯度洗脱摸索最佳洗脱条件，再优化成阶跃洗脱；对于流穿模式（目的蛋白不与介质结合），直接进行 CIP 即可。

7. 再生

建议每次纯化过程结束后，均用低 pH 缓冲液如：0.1 M acetate, pH 3.0 进行冲洗，去再用平衡缓冲液冲洗 5-10 CV，直至紫外、电导和 pH 基线平稳。

8. 在线清洗

当层析柱工作时反压明显增大，即表明介质需要进行在线清洗。根据杂质与层析介质相互作用的方式不同，可采取不同的清洗策略。

8.1 去除离子结合蛋白

2 M NaCl 缓冲液，清洗 0.5-5 CV。

8.2 去除弱疏水结合蛋白、沉淀蛋白、脂蛋白

1 M NaOH 溶液，正/反向清洗 1-2 CV（保留时间 15-30 min）。

8.3 去除强疏水结合蛋白、脂蛋白、脂质

70%乙醇或 30%的异丙醇，正/反向清洗 3-5 CV。

清洗后，均用纯水清洗 5-10 CV。再根据实验计划进行结合缓冲液平衡或保存处理。

注：使用高浓度有机溶剂清洗液时，应逐步增加有机溶剂浓度，避免层析柱中产生气泡。

9. 消毒

用 0.5-1.0 M NaOH 清洗层析柱，保留时间 1-2 h。

10. 保存

10.1 未开封的介质可以储存在 4-30 °C 环境中。

10.2 使用过的介质需用 20%乙醇进行置换，储存在 4-8 °C 环境中。